

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Jenis Penelitian dalam kegiatan ini adalah eksperimen murni sesungguhnya (*True Experimental Research*) yaitu penelitian yang digunakan untuk mengetahui kemungkinan saling berhubungan sebab akibat dengan cara menggunakan satu atau lebih kondisi perlakuan pada satu atau lebih kelompok eksperimen dan membandingkan hasil dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan (Sugiono, 2010).

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu rancangan *The posttest-only control group design* dan diasumsikan bahwa dalam suatu populasi tertentu, setiap unit populasi adalah homogen. Artinya karakteristik antar unit populasi adalah sama, maka pengukuran awal tidak dilakukan karena dianggap sama semua kelompok berasal dari satu populasi yang sama (Sugiono, 2010) berikut ini adalah merupakan bentuk rancangan penelitian *True Experimental* :

- K1 : Kontrol negatif (-)= menggunakan aquades
Kontrol positif (+) = menggunakan antibiotik (Tetrasiklin)
- A1 : Ekstrak Daun Petai Cina 25%
- A2 : Ekstrak Daun Petai Cina 50 %
- A3 : Ekstrak Daun Petai Cina 75 %
- A4 : Ekstrak Daun Petai Cina 100 %

3.1.2 Estimasi Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 4 kelompok perlakuan ekstrak daun petai cina dan 2 kelompok kontrol (kontrol positif dan kontrol negatif), sehingga ada 6 kelompok. Berdasarkan rumus (Notoatmodjo, 2010) :

$$(p-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan : p = jumlah kelompok

n = jumlah pengulangan

$$(p-1)(n-1) \geq 15$$

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dari hasil perhitungan diatas, didapatkan bahwa jumlah pengulangan yang diperlukan adalah sebanyak 4 kali. Dengan Rancangan Acak Lengkap pada penelitian ini menggunakan 6 perlakuan yang masing-masing diulang 4 kali. Sampel dalam penelitian ini adalah 24 cawan petri yang berisi biakan bakteri *Shigella dysenteriae*.

3.1.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan untuk menempatkan unit ekperimental dalam lingkungan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Rancangan jenis ini dilakukan di laboraturim dimana lingkungan laboraturium dianggap homogen. Peletakan perlakuan pada rancangan ini dilakukan secara acak, sehingga seluruh unit percobaan memiliki peluang yang sama besar untuk memperoleh perlakuan (Sugiono, 2010). Dengan Rancangan

Acak Lengkap (Tabel 3.1) menggunakan 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing 4 kali ulangan yang dilakukan dengan cara pengundian acak dan hasilnya sebagai berikut :

Tabel 3.1. Denah Rancangan Acak Lengkap

A2.2	K1.1	A1.1	A3.2
A3.1	A4.2	K1.6	A2.4
K1.5	A1.3	A3.4	A4.3
A4.1	A2.1	K1.7	K1.3
K1.2	A3.3	A4.4	A1.4
A1.2	K.1.4	A2.3	K1.8

Keterangan:

- K1 : Kontrol negatif (-) = menggunakan aquades
 Kontrol positif (+) = menggunakan tetrasklin
- A1 : Ekstrak Daun Petai Cina 25%
- A2 : Ekstrak Daun Petai Cina 50%
- A3 : Ekstrak Daun Petai Cina 75%
- A4 : Ekstrak Daun Petai Cina 100%

3.2 Populasi dan Teknik Sampling

3.2.1 Populasi

Populasi adalah keseluruhan objek yang diteliti, dimana yang dimaksud dalam penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysenteriae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Negeri Malang.

3.2.2 Sampel

Sampel adalah bagian populasi yang diambil sebagian namun harus mewakili populasi (Djaelani, 2013).

Sampel dalam penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Shigella dysenteriae* yang telah diinkubasi selama 1 x 24 jm pada suhu 37°C.

3.2.3 Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *simple random sampling*, yaitu cara pengambilan sampel dari anggota populasi dengan menggunakan acak tanpa memperhatikan strata (tingkatan) dalam anggota populasi tersebut.

3.3 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan selama satu bulan, dimulai dari bulan 10 Juli – 29 Agustus 2017. Pelaksanaan kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang yang berlokasi di Jalan Raya Tlogomas No. 246 Malang, Jawa Timur.

3.4 Jenis Variabel

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah dan dimanipulasi penelitian untuk mengetahui pengaruhnya. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berbagai konsentrasi ekstrak Daun Petai Cina (*Leucaena leucocephala*).

3.4.2 Variabel Terikat

Varabel terikat adalah faktor yang diukur dan diketahui perubahannya untuk mengetahui akibat dari variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini

adalah aktivitas pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* (diameter zona hambat) yang ditandai dengan munculnya zona bening yang diukur menggunakan jangka sorong sebagai tanda adanya hambatan pertumbuhan hingga kematian bakteri pada medium *Nutrient Agar* yang telah diberi ekstrak daun petai cina.

3.4.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang sengaja dikendalikan agar tidak mempengaruhi variabel bebas dan terikat. Variabel kontrol pada penelitian ini adalah medium biakan yaitu *Nutrient Agar* (NA) dengan suhu inkubasi 37°C selama 1 x 24 jam dan diberi peper disk berdiameter 1 cm serta ditanam bakteri *Shigella dysenteriae*.

3.5 Definisi Operasional Variabel

- a. Daun petai cina yang digunakan adalah bagian daunnya yang sudah tua maupun yang masih muda.
- b. Bakteri *Shigella dysenteriae* yang digunakan merupakan biakan murni dari bakteri penyebab diare berdarah atau disentri basiler yang diperoleh Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Negeri Malang.
- c. Ekstraksi proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan tidak saling larut yang berbeda.
- d. Konsentrasi ekstrak daun petai cina adalah ekstrak yang diperoleh dari daun petai cina dengan beberapa pengenceran 25%, 50%, 75% dan 100% perhitungan pembuatan konsentrasi ekstrak tanaman daun petai cina menggunakan rumus sebagai berikut :

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

Keterangan:

N1 = Konsentrasi awal

V1 = Volume yang dicari

N2 = Konsentrasi yang diinginkan

V2 = Volume yang diinginkan

1. Konsentrasi 25% didapatkan dari:

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$100 \cdot V1 = 25 \cdot 5$$

$$V1 = 125 : 100$$

$$V1 = 1,25 \text{ ml}$$

(1,25 ml ekstrak daun petai cina *Leucena leucocephala* dan 3,75 ml aquadest)

2. Konsentrasi 50% didapatkan dari:

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$100 \cdot V1 = 50 \cdot 5$$

$$V1 = 250 : 100$$

$$V1 = 2,5$$

(2,5 ml ekstrak daun petai cina *Leucena leucocephala* dan 2,5 ml aquadest)

3. Konsentrasi 75% didapatkan dari:

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$100 \cdot V1 = 75 \cdot 5$$

$$V1 = 37,5 : 100$$

$$V1 = 3,75$$

(3,75 ml ekstrak daun petai cina *Leucena leucocephala* dan 1,25 ml aquadest)

4. Konsentrasi 100% didapatkan dari:

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$100 \cdot V1 = 100 \cdot 5$$

$$V1 = 500 : 100$$

$$V1 = 5$$

(5 ml ekstrak daun petai cina)

- e. Media biakan yang digunakan dalam pengujian zona hambat terhadap bakteri *Shigella dysentriae* adalah media NA (*Nutrien Agar*)
- f. Diameter zona hambat adalah daerah yang terpengaruh oleh suatu zat antibakteri. Berpengaruh atau tidaknya suatu bahan antibiotik dapat dilihat dari besar kecilnya area yang tidak ditumbuhi bakteri. Diketahui dengan munculnya zona bening atau hambat yang diukur menggunakan jangka sorong.
- g. Suhu inkubasi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan 37°C, dan lama inkubasi adalah 1 x 24 jam.

3.6 Perkembangbiakan Bakteri *Shigella dysentriae*

Langkah awal yang dilakukan adalah dengan mengambil isolat bakteri pada tabung reaksi, menggunakan kapas swap. Menggoreskan bakteri ke media NA (*Nutrient Agar*) padat dengan pola zig-zag, selanjutnya memberi label pada cawan petri berupa nama isolat dan tanggal penanaman. Bakteri yang telah ditanam tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam sampai bakteri *Shigella dysentriae* tumbuh dan membentuk koloni.

3.7 Metode Pengambilan Data

Metode yang digunakan untuk pengambilan data dalam penelitian ini menggunakan observasi eksperimen, yaitu teknik pengambilan data secara langsung yang dilakukan di laboratorium dengan prosedur berencana yang dilakukan dengan melihat dan mencatat aktifitas atau kegiatan terhadap objek perlakuan.

Pengambilan data dilakukan dengan mengukur zona bening berbagai konsentrasi ekstrak daun peti cina (*Leucaena leucocephala*) pada media *Nutrient Agar* oleh koloni bakteri *Shigella dysenteriae* dengan menggunakan jangka sorong, kemudian data yang diperoleh dicatat dalam Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Data Rerata

Konsentrasi Ekstrak	Ulangan			Jumlah Luas Zona Hambat Bakter (mm)	Rerata Luas Zona Hambat Bakteri (mm)
	1	2	3		

3.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dibagi menjadi 3 tahap, yaitu: tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap pengamatan.

3.4.4 Tahap Persiapan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

Tabel 3.3. Alat yang digunakan dalam penelitian.

No	Nama alat	Jumlah	Kegunaan
1	Handsocon	1 Pack	Mencegah terjadinya penularan bakteri dari media ke tangan
2	Beaker Glass 1000 ml	4 buah	Mencampur ekstrak
3	Baskom	3 buah	Mencuci tanaman yang dibuat ekstrak
4	Saringan	2 buah	Menyaring ekstrak
5	Timbangan analitik	1 buah	Menimbang bahan (Daun Petai Cina)
6	Oven	1 buah	Mengeringkan ekstrak
7	Blender	2 buah	Menghaluskan ekstrak

8	Erlenmeyer 1000 ml	2 buah	Tempat menyimpan ekstrak
9	<i>Rotaty Evaporator</i>	1 buah	Alat untuk proses ekstraksi
10	Corong Buchner	1 buah	Untuk menyaring ekstrak
11	Spatula	1 buah	Untuk mengaduk ekstrak
12	Cawan Petri	30 buah	Tempat pembiakan mikroba
13	Karet Hisap	2 buah	Untuk menghisap cairan pada pipet
14	Pipet	1 buah	Untuk mengambil cairan
15	Kamera Digital	1 buah	Dokumentasi
16	Pipet Tetes	3 buah	Meneteskan ekstrak pada luka
17	Masker	1 pack	Menutup mulut
18	LAF (<i>Laminar Air Flow</i>)	1 buah	Tempat melaksanakan penumbuhan mikroba secara aseptik
19	Kain Saring	1 meter	Menyaring ekstrak
20	Kertas Saring	1 gulung	Menyaring ekstrak dari residu
21	<i>Aluminium Foil</i>	1 gulung	Menutup bahan atau ekstrak
22	Bunsen	1 buah	Untuk mensterilisasi alat-alat
23	Inkubator	1 buah	Untuk penyimpanan penanaman mikroba
24	Pinset	1 buah	Untuk mengambil benda
25	Jarum Ose	2 buah	Untuk mengambil dan memindahkan mikroba
26	<i>Paper Disk</i>	1 pack	Untuk menaruh mikroba

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

Tabel 3.4. Bahan yang digunakan untuk penelitian.

No.	Nama bahan	Jumlah
1	Alkohol 70 %	500 ml
2	Daun Petai cina	1000 gram
3	Bakteri <i>Shigella Dysenteriae</i>	1 tabung reaksi
4	Aquades	10 liter
5	Larutan Sampel	500 ml

No.	Nama bahan	Jumlah
6	Media NA	20 gram
7	Kertas Label	1 lembar
8	Etanol 96%	2 liter

3.4.5 Tahap pelaksanaan Penelitian

Pembuatan Ekstrak Tanaman Daun Petai Cina (*Leucaena leucocephala*):

1. Mencuci bersih tanaman Daun Petai Cina (*Leucaena leucocephala*) sebanyak 1000 gram lalu di kering angin-anginkan hingga tidak mengandung air.
2. Memilih tanaman Petai Cina (*Leucaena leucocephala*) yang bagus dan memisahkan dari akarnya.
3. Menghaluskan bahan yang telah kering menggunakan blender.
4. Memasukan daun tumbukan tanaman Petai Cina (*Leucaena leucocephala*) ke dalam erlenmeyer dan *beaker glass*.
5. Memberi larutan etanol 96% sebanyak 2 liter yang dibagi menjadi 4 empat tempat, masing-masing 250 gr tanaman Daun Petai Cina (*Leucaena leucocephala*) diberi 500 ml etanol 96%.
6. Menutup erlenmeyer dengan alumunium foil.
7. Menyimpan bahan pada ruang tertutup selama 2 x 24 jam untuk dilakukan proses maserasi.
8. Menyaring ekstrak menggunakan corong *buchner* dan kain saring yang kemudian diambil filtratnya.
9. Filtrat atau hasil ekstrak dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 69°C sampai 80°C.
10. Hasil evaporasi disimpan didalam oven dengan suhu 40°C.

3.9 Langkah-langkah Dalam Penelitian

Prosedur dalam penelitian ini meliputi :

1. Strilisasi alat

- a. Mencuci semua peralatan yang dibutuhkan dengan sabun hingga bersih dengan air mengalir.
- b. Alat-alat yang dapat disterilisasi dalam autoklaf dibungkus dengan kertas dan dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Dan alat-alat yang tidak dapat disterisasi dengan menggunakan autoklaf bisa disetrilisai dengan alkohol 70%.

2. Pembuatan media agar *Shigella dysentriae*

- a. Menimbang serbuk agar *Shigella dysentriae*

Perhitungan pembuatan media Agar :

$$24 \text{ cawan petri} = 24 \times 15 \text{ ml/cawan petri}$$

$$= 360 \text{ ml}$$

$$\text{Serbuk Agar} = 360 \text{ ml} \times \text{standart} / 1000$$

$$= 360 \times 60 \text{ ml} / 1000$$

$$\text{Serbuk Agar} = 21,6 \text{ gram}$$

Kemudian memasukkan bahan yang telah ditimbang kedalam elemeyer dan tutup dengan *aluminium foil*.

- a. Memanaskan diatas *hot plate* selama 10-15 menit hingga larutan homogen dan berwarna bening.
- b. Setelah larutan homogen biarkan hingga agak dingin dan tuangkan ke dalam cawan petri sebanyak 15 ml yang sudah disterilkan dan biarkan hingga mengeras.

3. Penanaman bakteri *Shigella dysenteriae* pada media NA

- a. Memasukkan media NA, suspensi *Shigella dysenteriae*, cotton swap, bunsen, *paper disk*, dan ekstrak daun petai cina kedalam biakan bakteri.
- b. Menyalakan api bunsen.
- c. Mengambil bakteri *Shigella dysenteriae* menggunakan *cotton swap*.
- d. Membuka cawan petri dengan menggoreskan *cotton swap* diatas medium NA secara *streaking* dengan langkah berikut :
 1. Goresan dimulai pada setengah permukaan lempeng agar.
 2. Memutar lempeng agar (cawan petri) 180° dan dilakukan penggoresan pada sisa permukaan lempeng.
 3. Memutar lempeng agar (cawan petri) 90° dan dilakukan penggoresan pada setengah permukaan lempeng agar yang sudah digores.
 4. Memutar lempeng agar (cawan petri) 180° dan dilakukan penggoresan pada sisa permukaan lempeng agar yang sudah digores.
 5. Mengambil ekstrak daun petai cina dengan mencelupkan *paper disk* pada ekstrak daun petai cina.
 6. Dengan menggunakan pinset steril mengambil *paper disk* dan diletakkan pada bagian tengah media NA.
 7. Menutup kembali cawan petri dan memutar mutar pada api bunsen.
 8. Lakukan semua perlakuan hingga selesai.
 9. Mengelurkan dari enkas dan meletakkan dalam inkubator seama 24 jam pada suhu 37°C.

10. Setelah 24 jam semua cawan petri dikeluarkan dari inkubator dan melakukan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong.

6. Pengamatan

- a. Meletakkan cawan petri berderet di atas meja sesuai dengan konsentrasi.
- b. Meletakkan cawan petri secara terbalik, tutup cawan tidak dibuka.
- c. Mengukur diameter zona hambat *Shigella dysenteriae* dengan jangka sorong.

3.10 Pengujian Antibakteri Ekstrak Daun Petai Cina terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*

Langkah awal yang dilakukan yaitu dengan mensterilisasikan LAF (*Laminar Air Flow*) menggunakan lampu sinar UV, menyalakan blower dan menghidupkan bunsen selama 60 menit serta menyemprot ruangan LAF menggunakan alkohol 70%. Membuka media NA padat dari plastik wrap dan di sterilisasi menggunakan api bunsen. Isolat yang sudah dibiakkan disterilisasi menggunakan api bunsen. Menaruh kertas cakram pada media NA padat. Mengambil bakteri *Shigella dysenteriae* dan menaruhnya pada media NA padat yang telah di isi kertas cakram. Menambahkan Ekstrak tanaman daun petai cina sebanyak : 25%, 50% 75% dan 100% serta menambahkan aquades sebagai kontrol. Membungkus dengan plastik warp dan setelah itu di taruh pada inkubator dengan suhu ruangan (37°C) setelah di inkubasi selama 24 jam, dilakukan pengamatan.

3.11 Tahap Pengamatan

Pengamatan dilakukan 1 hari setelah perlakuan serta dilakukan pengamatan dengan cara sebagai berikut:

a. Ada tidaknya zona hambat

Mengamati biakan bakteri yang telah diberi perlakuan dengan cara melihat zona hambat pada *paper disk*. Zona hambat umumnya muncul cairan bening pada sekitar *paper disk*.

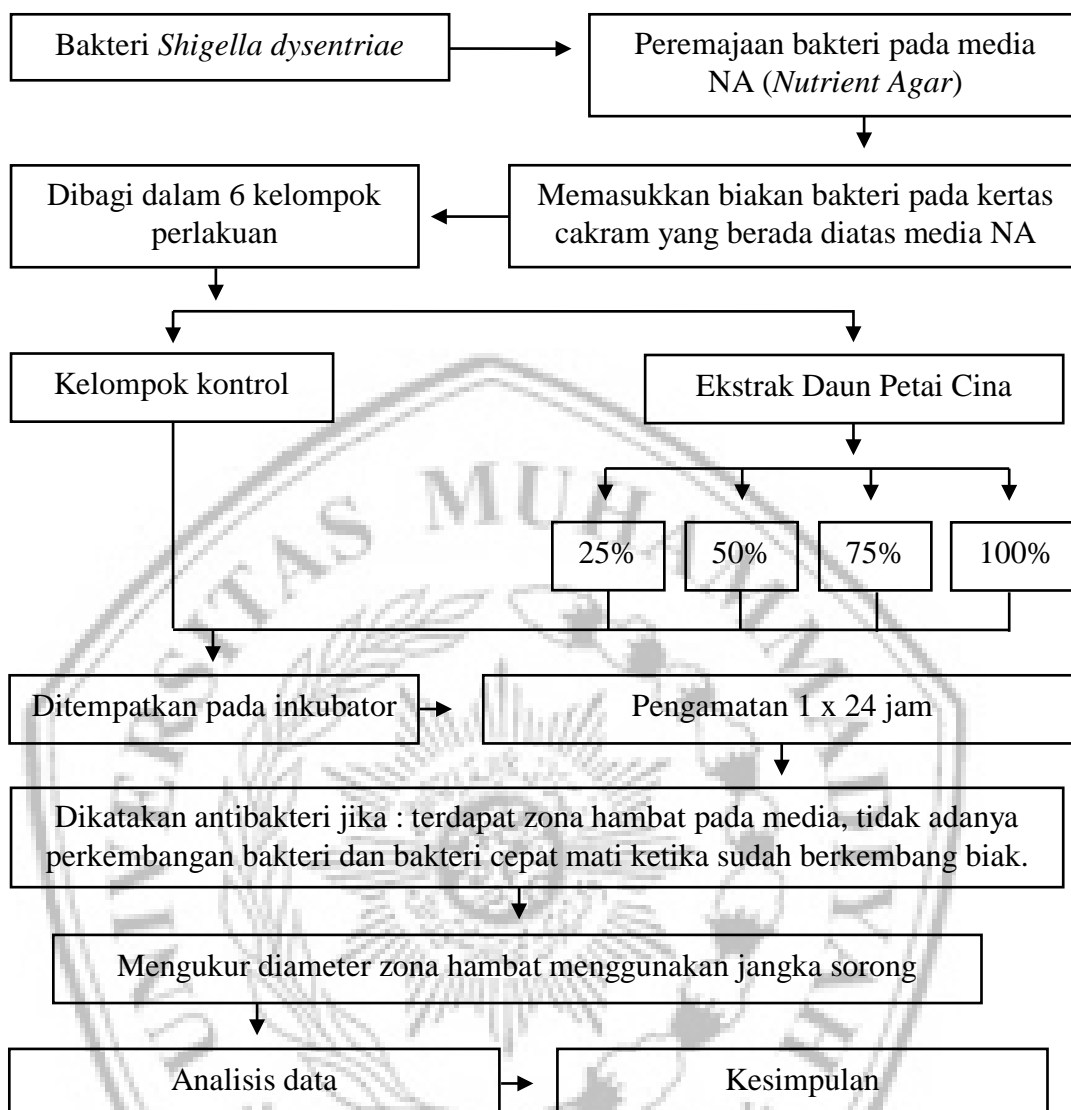
b. Diameter

Mengukur diameter zona hambat yang muncul menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada bagian bawah cawan petri dan jangka sorong diletakkan sesuai munculnya diameter zona hambat sekitar *paper disk*.

c. Waktu munculnya zona hambat

Pengamatan dilakukan mulai dari hari pertama setelah perlakuan diberikan dan menghitung mulai hari ke-berapa keluar zona hambat.

3.10.1 Kerangka Kerja Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Kerja Penelitian

3.12 Teknik Analisis Data

Analisi data yang dilakukan dengan menggunakan SPSS. Dimana yang di uji dengan menggunakan analisis varian satu jalan (*ANOVA one-way*). Pertama yang harus dilakukan adalah uji asumsi normalitas dan uji asumsi homogenitas. Jika, data yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen, maka akan dilanjutkan dengan uji analisis varian satu jalur. Uji ini dilakukan untuk mengetahui adakah pengaruh pemberian konsentrasi daun petai cina (ekstrak

25%, 50% 75%, dan 100% terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae*. Selanjutnya apabila uji analisis varian dapat dilakukan maka dapat dilanjutkan dengan uji beda. Uji beda yang dilakukan menggunakan uji *Duncan* untuk mengetahui konsentrasi manakah yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae*.

